

リアルタイム PCR 法を用いた浴槽水等のレジオネラ属菌 迅速検査法の開発

松永典久・高橋直人・古賀舞香・丸山浩幸

福岡市保健環境研究所保健科学課

Improvement of the Detection of *Legionella* spp. in Water Sample such as Bath Water by Real-Time PCR

Norihisa MATSUNAGA , Naoto TAKAHASHI, Maika KOGA
and Hiroyuki MARUYAMA

Health Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment

Summary

Real-time PCR (qPCR) assays for the detection of *Legionella* spp. (*L. spp.*) in environmental water used in bath and cooling tower were improved. In this study two rapid test methods were evaluated by comparison of the qPCR results and conventional culture. In the first method, we used 500mL of water samples. We filtered for concentration and we extracted the DNA by Hot DNA Extraction method after low-speed centrifugation and washing steps. Among 448 samples, 58 samples that were positive by the culture method were all positive by the qPCR method. 263 samples that were negative by the qPCR method were all negative by the culture method. In the second method, we used 10mL of water samples. We centrifuged for concentration, and we extracted the DNA by Hot-Alkaline DNA Extraction method. Among 36 samples, 6 samples inhibited PCR amplification. Among 14 samples that were positive by the culture method, one sample was negative by qPCR method. From these results, it was confirmed that the first method is useful as a rapid test method for *L. spp.* in water samples.

Key Words : レジオネラ属菌 *Legionella* spp. , レジオネラニューモフィラ *Legionella pneumophila*, リアルタイム PCR Real-Time PCR, 低速遠心 low speed centrifugation, 熱抽出法 Hot DNA Extraction, 浴槽水 Bath water, スクリーニング検査 Screening test

1 はじめに

福岡市では、公衆浴場や旅館等の環境衛生関係施設の衛生水準の維持・向上を図り、抵抗力の弱い高齢者や乳幼児が利用する社会福祉施設の衛生対策支援を目的に行政による検査を行っており、レジオネラ症防止対策として入浴施設のレジオネラ属菌（以下 *L. spp.*）検査を行っている。

従来の培養法¹⁾による *L. spp.*検査は、結果を得るのに7～10日間の長い日数を要する。このためレジオネラ症患者発生時における迅速な原因施設の特定または原因疑似施設の陰性確認が求められている。

特に、医療機関におけるレジオネラ感染疑い事例²⁾等では、入所者の衛生確保には入浴施設の速やかな使用再開が必要であり、迅速な陰性確認が求められた。

そこで陰性確認用の迅速なスクリーニングを目的として、リアルタイム PCR（以下 qPCR）法を用いた浴槽水等のから *L. spp.* 遺伝子の検出法を検討した。本市が行っている *L. spp.* 検査に適した方法とするために、低速遠心工程を追加した熱抽出による遺伝子抽出法を用いる方法及び検体量を大幅に減らした方法を検討、開発したので報告する。

2 実験方法

2.1 qPCR 法の特異性と定量性の確認

2.1.1 qPCR 試薬及び測定条件

*L. spp.*を検出するため Wellinghausen, N らの報告³⁾・⁴⁾をもとに 16S rRNA gene の領域に対してそのプライマー, プローブを作製した (Table 1).

また, PCR 反応阻害の可能性を確認するためにインターナルコントロール (以下 IC) を作製した³⁾. 上述の *L. spp.* 特異的プライマー配列を Lambda DNA 配列の一部の両端に付加し, pUC18 プラスミドにクローニングした. IC を検出するため Lambda DNA 領域に対してプローブを作製した.

Table 1 Primers and probes used in real time assay for *L. spp.* and Internal Control

Assey	Name	Sequences(5'-3')	Origin
<i>L. spp.</i>	JFP-F	AGGGTTGATAGGTTAAGAGC	4)
	JFP-R	CCAACAGCTAGTTGACATCG	4)
	Leg FL	FAM-AGTGGCGAAGGGCGCTACCT-TAMRA	3)
IC	LAMFL	Cy5-GGTGCCGTTCACTTCCCGAATAAG-BHQ3	3)

PCR 試薬には Premix Ex Taq (Perfect Real Time) (タカラバイオ) を用い, 終濃度 0.2 μM プライマー, 0.24 μM プローブ, 2×10^{-7} ng IC となるよう混合し, 5 μL の鋳型 DNA を加えて計 25 μL の反応系とした. qPCR 装置には, QuantStudio® 5 (Applied Biosystems) または Mx3005P Real Time PCR System (Stratagene) を用い 95°C 30 秒 1 サイクル → 95°C 5 秒, 60°C 20 秒 45 サイクルの反応を行った後, 実験データを解析し, Ct 値が得られたものを陽性とした.

2.1.2 特異性の確認

qPCR の特異性確認のため, 各種血清型の *L. pneumophila* 15 株 (serogroup (以下 SG) 1~15), *L. pneumophila* 以外の *L. spp.* 12 菌種 (*L. israelensis*, *L. erythra*, *L. cherrii*, *L. rubrilucens*, *L. steigerwaltii*, *L. bozemanii*, *L. jamestowniensis*, *L. maceachernii*, *L. micdadei*, *L. dumofii*, *L. londiniensis*, *L. spp.*) 12 株を供試した. 非 *Legionella* 属との反応性については, 当研究所で保存されている *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Rhodococcus equi*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella enterica*, *Streptococcus pyogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* 各 1 株, 計 15 株を用いて Ct 値の有無の確認を行った.

2.1.3 定量性の確認

*L. spp.*用プライマー配列を含む 16S rRNA gene 領域の合成 DNA 断片 (gBlock) を TE 緩衝液 (pH 8.0) (ニッポンジーン) (以下 TE) で段階希釈したものを用い, qPCR 結果より決定係数 (以下 R^2 値), PCR 増幅効率, 検出下限値を確認した.

2.2 標準量検体での迅速検査法 (以下標準量迅速検査法)

培養法で使用する検水と同量の検体での迅速検査を検討した. 検水の濃縮は第 3 版レジオネラ症防止指針 (以下防止指針) に記載のろ過濃縮法⁵⁾ に準じた. 遠心は微量高速冷却遠心機 MX-205 (TOMY) を用いた.

2.2.1 菌懸濁液を用いた標準量迅速検査法の検討

標準試料は, 当研究所の保存株である浴場水由来の *L. pneumophila* SG1 を BCYE α 寒天培地 (栄研化学, 極東製薬) で 36°C, 1~4 日間培養後, 滅菌水に懸濁した菌液 (以下 *L. p* SG1 菌懸濁液) を用いた.

1) 低速遠心工程追加の検討

遺伝子抽出における夾雑物の除去を目的とした低速遠心工程の追加を検討した.

土壌からの DNA 抽出法⁶⁾ を参考に濃縮液からの遺伝子抽出前に低速遠心工程を追加した. 1.0×10^4 CFU/mL 程度の *L. p* SG1 菌懸濁液 1.0 mL を 3,000rpm, 1, 5, 10 分及び 3,200rpm, 1 分の低速で遠心した. 上清を回収し, 沈渣は滅菌水 1.0 mL を添加後懸濁した. この上清及び沈渣の懸濁液各 100 μL を MWY 寒天培地に塗抹した. 36°C で 7 日間培養後生菌数を測定し低速遠心工程の回転数と時間を決定した.

2) 遺伝子抽出法の比較

約 1.4×10^7 CFU/mL の *L. p* SG1 菌懸濁液から 10 倍希釈系列の菌液を調整した. 各希釈液を 100 倍濃縮液として 500 μL を用いた. 濃縮液を 3,000rpm, 1 分低速遠心後上清を採取した. この上清を 12,000rpm, 5 分遠心した. 上清を除去し, 沈渣に滅菌水 500 μL を加えた. 12,000rpm, 5 分遠心後上清を除去し, 沈渣をアルカリ熱抽出法及び熱抽出法で遺伝子を抽出した. qPCR を行い両抽出法の Ct 値を比較した.

(1) アルカリ熱抽出法

抽出は腸管出血性大腸菌の通知法⁷⁾ に準じた. 沈渣に 50 mM NaOH 42.5 μL を加え 100°C 10 分加熱後, 1 M Tris-HCl (ニッポンジーン) 7.5 μL で中和し, 12,000rpm, 5 分遠心した上清を鋳型 DNA とした.

(2) 熱抽出法

沈渣に TE 50 μL を加え 100°C 10 分加熱後, 12,000rpm, 5 分遠心し, 上清を鋳型 DNA とした.

2.2.2 浴槽水等の検水を用いた標準量迅速検査法

検討

平成 28～29 年度に採取された市内公衆浴場浴槽水や冷却塔冷却水等の検水 466 検体を用いて、培養法、qPCR 法による *L. spp.* 検出を行った。

培養法は防止指針に記載のろ過濃縮法⁵⁾ に準じた。検水 500mL を、直径 47mm、孔径 0.2μm のポリカーボネート製メンブランフィルター (ADVANTEC) で吸引ろ過後、メンブランフィルターを 2.5mL 滅菌水で洗浄し 200 倍 (一部の検体は 100 倍) 濃縮液とした。濃縮液を等量のレジオネラ酸処理液 (0.2M HCl・KCl buffer pH2.2, 関東化学) で混和し 5 分間反応後、100μL を MWY 寒天培地に塗抹した。36°C で 7 日間培養後生菌数を測定した。

qPCR 法は濃縮液 500μL を 2.2.1.2) (2) と同様に低速遠心、滅菌水洗浄工程後熱抽出法で得られた遺伝子を鋳型 DNA とし、Ct 値が得られたものを陽性とした。

2.3 少量検体での迅速検査法 (以下少量迅速検査法)

培養法で使用する検水より少量の 10mL 検体での迅速検査を検討した。検水の濃縮は防止指針に記載の冷却遠心濃縮法⁵⁾ に準じた。遠心は高速冷却遠心機 RX-200 (TOMY), TA-23 を用いた。

遺伝子抽出はアルカリ熱抽出法で行った。濃縮液 500μL を 12,000rpm, 5 分遠心後上清を除去した。2.2.1.2) (1) と同様に抽出し、鋳型 DNA とした。

2.3.1 菌懸濁液を用いた少量迅速検査法の検討

標準試料は、*L. p* SG1 菌懸濁液を用いた。

4.3×10² CFU /mL の *L. p* SG1 菌懸濁液 10mL を 6,100rpm, 30 分, 6,600rpm, 7,100rpm 及び 7,400rpm で各 15 分遠心後、上清 9mL を除去して沈渣を攪拌・混合して濃縮液とした。濃縮液 100μL を MWY 寒天培地 (関東化学) に塗抹し、36°C で 7 日間培養後生菌数を測定し遠心の回転数と時間を決定した。

次に 7.2×10² CFU/mL の *L. p* SG1 菌懸濁液 10mL を 7,400rpm, 5, 10 及び 15 分遠心後、上清 9 mL を除去して沈渣を攪拌・混合して濃縮液として、その 100μL を MWY 寒天培地に塗抹した。36°C で 7 日間培養後生菌数を測定し、7,400rpm での遠心時間を決定した。

2.3.2 浴槽水等の検水を用いた少量迅速検査法検討

平成 29 年度に採取された市内公衆浴場浴槽水等の検水 36 検体を用いて、培養法、qPCR 法による *L. spp.* 検出を行った。

培養法は 2.2.2 と同様に濃縮、酸処理後 MWY 寒天培地にて *L. spp.* の検出を行った。

qPCR 法は検水 10mL を 7,400rpm, 5 分遠心後 2.3.1 と同様に濃縮した。アルカリ熱抽出法で得られた遺伝子を

鋳型 DNA とし、Ct 値が得られたものを陽性とした。

3 実験結果

3.1 qPCR 法の特異性と定量性の確認

各試験菌株に対して行った qPCR の結果を Table 2 に示した。本法で *Legionella pneumophila* を含むすべての *L. spp.* だけを検出した。

Table 2 A List of strains used for the validation of specificity of real-time PCR assay for *L. spp.*

Bacterial species	No. of strains	<i>L. spp.</i> Real-Time PCR
<i>L. pneumophila</i> SG1	1	Positive
<i>L. pneumophila</i> SG2	1	Positive
<i>L. pneumophila</i> SG3	1	Positive
<i>L. pneumophila</i> SG4	1	Positive
<i>L. pneumophila</i> SG5	1	Positive
<i>L. pneumophila</i> SG6	1	Positive
<i>L. pneumophila</i> SG7	1	Positive
<i>L. pneumophila</i> SG8	1	Positive
<i>L. pneumophila</i> SG9	1	Positive
<i>L. pneumophila</i> SG10	1	Positive
<i>L. pneumophila</i> SG11	1	Positive
<i>L. pneumophila</i> SG12	1	Positive
<i>L. pneumophila</i> SG13	1	Positive
<i>L. pneumophila</i> SG14	1	Positive
<i>L. pneumophila</i> SG15	1	Positive
<i>L. israelensis</i>	1	Positive
<i>L. erythra</i>	1	Positive
<i>L. cherrii</i>	1	Positive
<i>L. rubrilucens</i>	1	Positive
<i>L. steigerwaltii</i>	1	Positive
<i>L. bozemanii</i>	1	Positive
<i>L. jamestowniensis</i>	1	Positive
<i>L. maceachernii</i>	1	Positive
<i>L. micdadei</i>	1	Positive
<i>L. dumofii</i>	1	Positive
<i>L. londiniensis</i>	1	Positive
<i>L. spp.</i>	1	Positive
<i>Escherichia coli</i>	1	Negative
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	Negative
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	Negative
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	Negative
<i>Serratia marcescens</i>	1	Negative
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	Negative
<i>Rhodococcus equi</i>	1	Negative
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	Negative
<i>Aeromonas sobria</i>	1	Negative
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	Negative
<i>Clostridium perfringens</i>	1	Negative
<i>Salmonella enterica</i>	1	Negative
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1	Negative
<i>Campylobacter jejuni</i>	1	Negative
<i>Campylobacter coli</i>	1	Negative

次に、標準試料として、合成 DNA 断片を用いて定量性の確認を行った結果、R² 値は 0.99 以上となり、DNA 量と Ct 値は高い相関を示した (Fig. 1)。PCR 増幅効率 は 95.3%であった。検量線は 10 ~ 10⁵ copies/ウェルの範囲で直線性が得られ、Ct 値が得られないこともあるが 1copy/ウェルまで検出できた。

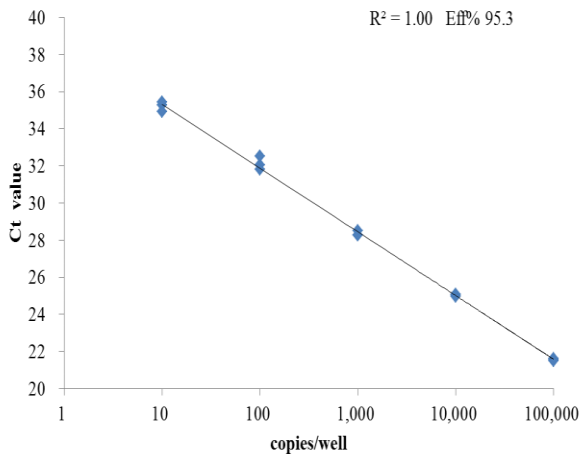


Fig. 1 Dynamic range and sensitivity of real-time PCR assay for *L. spp.* Standard curves of 10-fold dilution of gBlocks Gene Fragments.(from 1.0×10^1 to 1.0×10^5 copies/well)

3.2 標準量迅速検査法

3.2.1 菌懸濁液を用いた標準量迅速検査法の検討

1) 低速遠心工程追加の検討

遠心の条件を変えて処理した濃縮液を培養した結果を示す (Table 3) . 上清から 95%以上の *L. spp.*を回収することができたことから, 遠心の回転数と時間は3,000rpm, 1分遠心とした.

Table 3 Comparison of the number of *L. spp.* supernatant and sediment by concentration steps

rpm	min	CFU/mL	
		supernatant	sediment
3,000	1	1.4×10^4	7.6×10^2
3,000	5	7.4×10^3	1.1×10^3
3,000	10	7.0×10^3	1.2×10^3
3,200	1	1.3×10^4	3.3×10^2

2) 遺伝子抽出法の比較

$1.4 \times 10^5 \sim 1.4 \times 10^3$ CFU/mL に段階希釈した菌懸濁液におけるアルカリ熱抽出法での qPCR の Ct 値は, 21.4, 26.0, 28.0 であり, 熱抽出法での qPCR の Ct 値は, 24.0, 27.1, 32.2 であった. 両抽出法での Ct 値の差は, 1.1~4.2 となり, アルカリ熱抽出法が熱抽出法に比べて高効率であった.

しかし, 抽出効率は低いながら操作が簡便な低速遠心後熱抽出法において, もとの菌懸濁液に換算して 1.4×10^1 CFU/mL (濃縮前の検水約 30CFU/100mL) 相当を qPCR で検出することができた. R^2 値は 0.97 となり, 菌量と

Ct 値は比較的高い相関を示した. PCR 増幅効率は 113.5%であった (Fig. 2) .

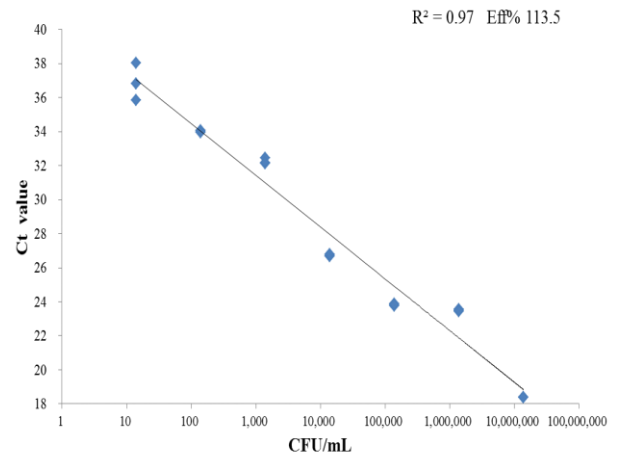


Fig. 2 Dynamic range and sensitivity of real-time PCR assay for *L. spp.* Standard curves of 10-fold dilution of DNA extracted from *L. pneumophila* SG1.(from 1.4×10^1 to 1.4×10^7 CFU/mL)

3.2.2 浴槽水等の検水を標準量迅速検査法用いた検討

培養法陽性である 58 検体すべてで *L.spp.*遺伝子が検出されたことから, 培養法陽性に対する qPCR 法陽性の感度は 100%であった. また, 培養法陰性 390 検体中 263 検体で *L. spp.*遺伝子不検出となり, 培養法陰性に対する qPCR 法陰性の特異度は 67.4%であった (Table 4) . なお, qPCR を実施した結果, IC が検出されず PCR 反応に問題があったものが 18 検体あった.

Table 4 Comparison of *L. spp.* detection number of water samples by Real-Time PCR assay and Culture method

<i>L. spp.</i>	Real-Time PCR	
	Positive	Negative
Positive	58	0
Negative	127	263

培養法による生菌数 (CFU / 100mL) と遺伝子 Ct 値との間に相関が認められないか検討したところ, 生菌数が 10 CFU / 100mL 以上では R^2 値が 0.18 と相関は認められなかったが, 生菌数が 2.5×10^2 CFU/100mL 超過では R^2 値が 0.62 であり, やや相関が認められた (Fig. 3) .

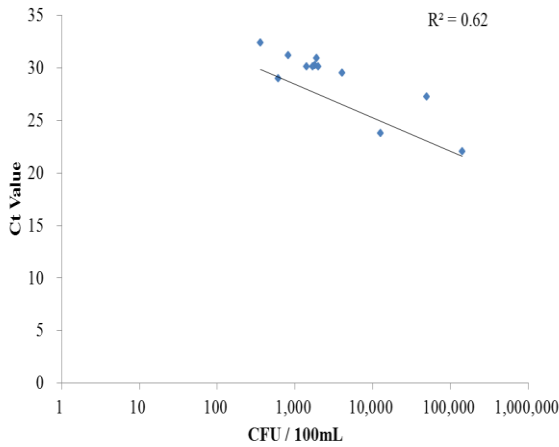


Fig. 3 Comparison of *L. spp.* culture results with Real-Time PCR results for water samples(over 2.5×10^2 CFU/100mL)

3.3 少量迅速検査法

3.3.1 菌懸濁液を用いた少量迅速検査法の検討

遠心の条件を変えて処理した濃縮液を培養した結果を Table 5 に示した。6,100~7,400rpm の遠心条件で得られた濃縮液の培養結果に差は認められなかった。

Table 5 The Effectiveness of concentration steps at 6,100rpm to 7,400rpm

rpm	min	CFU/mL
6,100	30	2.5×10^3
6,600	15	2.6×10^3
7,100	15	2.7×10^3
7,400	15	2.8×10^3

7,400rpm における遠心時間の違いによる濃縮液の培養結果を Table 6 に示した。7,400rpm における遠心時間による差は認められなかった。

Table 6 The Effectiveness of concentration steps at about 7,400rpm

rpm	min	CFU/mL
7,400	15	5.2×10^3
	10	4.7×10^3
	5	4.9×10^3

3.3.2 浴槽水等の検水を用いた少量迅速検査法検討

qPCR の結果, IC が検出されず PCR 反応に問題があったものが 6 検体あった。残る検水 30 検体のうち培養法陽性 14 検体中 13 検体で *L. spp.* 遺伝子が検出され, 培養法に対する感度は 92.9%であった。また, 培養法陰性 16 検体中 14 検体で *L. spp.* 遺伝子不検出となり, 培養法に対する特異度は 87.5%であった (Table 7)。検水 30 検体のうち培養法陽性かつ *L. spp.* 遺伝子不検出となった 1 検体の菌数は 10cfu/100mL であった。

なお, 3.2.2 の標準量迅速検査法の検討で使用した検水のうち 36 検体を同一の検体 (以下同一検体) として 3.3.2 の少量迅速検査法の検討で用いた。同一検体の標準迅速検査法による qPCR 結果においては, IC が検出されず PCR 反応に問題があったものは 2 検体であった。

Table 7 Comparison of *L. spp.* detection number of water samples by Real-Time PCR assay and Culture method

<i>L. spp.</i>	Real-Time PCR	
	Positive	Negative
culture method	13	1
	2	14

4 考察

今回使用した qPCR は当所保有 *L. spp.* に対する特異性及び定量性が確認された。そこで, 本 qPCR を *L. spp.* 迅速検査に用いることにした。

標準量迅速検査法の検討においてアルカリ熱抽出法と熱抽出法の抽出効率を比較した。西尾らは, 遺伝子抽出法は, 熱抽出法よりもアルカリ熱抽出法が検出感度が良いと報告している⁸⁾。qPCR測定値を比較したところ, 熱抽出法はアルカリ熱抽出法に比べ, Ct値で1~4程度大きくなったが, 菌懸濁液で濃縮前の検水約30CFU/100mL相当を検出することができた。また, 本qPCRは合成DNA断片で検討した結果, 1copy/ウェルを検出することができたことから, 熱抽出法で検出可能と考えた。一方, PCRの反応液中に腐植物質が含まれると, DNAポリメラーゼ反応が著しく阻害されること⁹⁾が知られている。さらに, わが国に広く分布する火山灰土壌の中には微生物細胞¹⁰⁾やDNA¹¹⁾を強く吸着するものもあることが知られている。本市では, 浴槽水等の原水として水道水を使用している施設が多いことから, 腐食物質や火山灰土

壤等の混入は少ないと考えられ、標準量迅速検査法に熱抽出法は使用可能であると判断し、アルカリ熱抽出法よりも簡便であるため採用した。

実際の浴槽水等検水で標準量迅速検査法を実施した。その結果培養法陽性検体は、すべて*L. spp.*遺伝子が検出された。また、qPCRで*L. spp.*遺伝子が不検出であった検体は、すべて培養法で陰性となった。このことから、標準量迅速検査法は、浴槽水等における*L. spp.*陰性確認用スクリーニング検査として有効であることが示唆された。

浴槽水等の*L. spp.*検査は培養法も迅速検査（遺伝子検査）法も検水の濃縮液を使用する。しかし、濃縮でPCR阻害物質も濃縮される可能性があることや検水によって目詰まりをしやすく過に時間を要する。培養法で*L. spp.*は非濃縮検体からのみ検出されたものも多いとの報告^{1,2)}がある。このため、これまでの迅速検査法よりも少量の検体で検査が可能ではないかと考えた。そこで、培養法の1/50の量である検水10mLでの少量迅速検査法構築を試みた。冷却遠心濃縮法⁵⁾の6,000×g, 30分と同等以上となるよう検討した遠心の回転数は、最も濃縮効率の良かった7,400rpm（約9,000×g）を、同回転数における時間は、各条件で差が認められなかったので最短の5分とした。ICが検出されPCR反応に問題のなかった検体については、培養法に対する感度は92.9%と良好であったが、培養法陽性（10CFU/100mL）かつ*L. spp.*遺伝子不検出となった検体が1検体あった。その原因として、*L. spp.*検出はろ過濃縮法が冷却遠心濃縮法よりも優れている^{1,3)}と報告されていることから、濃縮法の違いによる可能性がある。また、少量迅速検査法で検出できなかった検体は、検水中の*L. spp.*が10CFU/100mLと少なく、使用した検水量が少ないことから、検水中の*L. spp.*が採取できていなかったこと、qPCRに供した鋳型DNA量が少なかったことが可能性として考えられる。さらに、少量迅速検査法は、PCR反応阻害が16.7%と多かった。以上のことから、少量迅速検査法は検証や改良が必要であり、浴槽水等における*L. spp.*陰性確認用スクリーニング検査には標準量迅速検査法が有用であることが確認された。

謝辞

本研究を行うにあたり、ご助言を頂いた国立感染症研究所細菌第一部 前川純子氏に御礼申し上げます。

文献

- 1) 財団法人 ビル管理教育管理センター：新版 レジオラ症防止指針，2000
- 2) 松田正法ほか：病院内冷却塔からのレジオネラ感染疑い事例—福岡市，病原微生物検出情報 31, 1, 13-14, 2015
- 3) Nele Wellinghausen et al. : Detection of Legionellae in Hospital Water Samples by Quantitative Real-Time LightCycler PCR, Applied and Environmental Microbiology, 67, 9, 3985-3993, 2001
- 4) Daniel Jonas et al. : Enzyme-Linked Immunoassay for Detection of PCR-Amplified DNA of Legionellae in Bronchoalveolar Fluid, J. Clin Microbiol, 33, 5, 1247-1252, 1995
- 5) 財団法人ビル管理教育管理センター：第3版レジオネラ症防止指針，2009
- 6) 星野裕子ほか：土壌からのDNA抽出, Journal of Environmental Biotechnology, 5, 1, 45-53, 2005
- 7) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長：腸管出血性大腸菌 O26, O103, O111, O121, O145 及び O157 の検査法について，平成26年11月20日付け食安監発1120第1号，2010
- 8) 西尾智裕ほか：魚介類からの腸炎ビブリオ検出における遺伝子検出法の検討，感染症誌, 89, 445-451, 2015
- 9) Tebbe, C.C. and W. Vahjen. : Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. Appl. Environ. Microbiol., 59, 2657-2665, 1993
- 10) Hasebe, A., J. Koike, and H. Katou. : Strong retardation in the transport of Burkholderia cepacia during infiltration into a volcanic ash soil. Microbes Environ., 18, 32-37, 2003
- 11) Frostegard, A et al. : Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. Appl. Environ. Microbiol., 65, 5409-5420, 1999
- 12) 森本洋ほか：浴槽水中のレジオネラ属菌検査における非濃縮検体の重要性，北海道立衛生研究所報, 61, 21-23, 2011
- 13) 森本洋ほか：濃縮方法の違いによる温泉水中のレジオネラ属菌検出結果の比較，北海道立衛生研究所報, 59, 73-74, 2009

要約

qPCRによる浴槽水等検水中のレジオネラ属菌迅速検査法の開発を行った。2種類の迅速検査法を従来の培養法と比較し検討した。最初の方法では、検水500mLを使用した。ろ過濃縮し、低速

遠心及び洗浄工程後に熱抽出法により遺伝子を抽出した。448 検体中培養法で陽性であった 58 検体はすべて qPCR 法で陽性となり, qPCR 法陰性であった 263 検体はすべて培養法陰性となった。2 番目の方法では, 検水 10mL を使用した。遠心濃縮し, アルカリ熱抽出法で遺伝子を抽出した。36 検体中 PCR 反応阻害が 6 検体あり, また培養法陽性 14 検体中 1 検体で qPCR 法が陰性となった。この結果から, 最初の方法による本迅速検査法はレジオネラ属菌のスクリーニング検査法として有用であることが確認された。